

**DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN FRAGMENTO
DEL GEN DE LA ENVOLTURA DEL VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA MEDIANTE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN VACAS LECHERAS
DE PASTO, NARIÑO**

MARCELO JOAN SEBASTIAN MUÑOZ VALLEJO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2015**

**DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN FRAGMENTO
DEL GEN DE LA ENVOLTURA DEL VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA MEDIANTE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN VACAS LECHERAS
DE PASTO, NARIÑO**

MARCELO JOAN SEBASTIAN MUÑOZ VALLEJO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Médico Veterinario**

**Presidente:
BIBIANA BENAVIDES BENAVIDES
MV, MSc.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2015**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”.

Artículo primero del acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN:

BIBIANA BENAVIDES BENAVIDES
DIRECTORA DE TESIS

SANDRA SALAS R
JURADO DELEGADO

BOLIVAR LAGOS FIGUEROA
JURADO EVALUADOR

San Juan de pasto, Noviembre 2015

DEDICATORIA

DEDICO:

A MIS PADRES, MARCELO Y OMAIRA POR DARME LA VIDA, POR TODO SU ESFUERZO PARA QUE YO PUDIERA LOGRAR MIS SUEÑOS, POR MOTIVARME Y DARME LA MANO CUANDO SENTÍA QUE EL CAMINO SE TERMINABA, A USTEDES POR SIEMPRE MI CORAZÓN Y MI AGRADECIMIENTO.

A MI HERMANO DANIEL ALEJANDRO POR SER UN GRAN AMIGO PARA MÍ, QUE JUNTO A SUS IDEAS HEMOS PASADO MOMENTOS INOLVIDABLES Y POR SER UNO DE LOS SERES MÁS IMPORTANTES EN MI VIDA.

A MIS ABUELOS QUE GRACIAS A SU SABIDURÍA INFLUYERON EN MI LA MADUREZ PARA LOGRAR TODOS LOS OBJETIVOS EN LA VIDA, ES PARA USTEDES ESTÁ TESIS EN AGRADECIMIENTO POR TODO SU AMOR.

A VIVIANE ANDREA, POR BRINDARME SU AMOR, COMPAÑÍA Y TODO SU APOYO INCONDICIONAL.

A MIS AMIGOS, LOS QUE HAN ESTADO EN LAS CIRCUNSTANCIAS BUENAS COMO EN LAS COMPLEJAS.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a la profesora

Bibiana Benavides Benavides

Y a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

| | Pág |
|---|-----|
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA | 14 |
| 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA | 15 |
| 3. OBJETIVOS | 16 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL | 16 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 4. MARCO TEÓRICO | 17 |
| 4.1 ETIOLOGÍA | 17 |
| 4.2 EPIDEMIOLOGIA | 18 |
| 4.3 TRANSMISIÓN | 19 |
| 4.3.1 TRANSMISIÓN HORIZONTAL | 19 |
| 4.3.2 TRANSMISIÓN VERTICAL | 20 |
| 4.4 PATOGENIA | 21 |
| 4.5 SINTOMATOLOGÍA | 23 |
| 4.6 LESIONES | 24 |
| 4.7 DIAGNÓSTICO | 26 |
| 5. DISEÑO METODOLÓGICO | 28 |
| 5.1 TIPO Y LUGAR DE ESTUDIO | 28 |
| 5.2 SELECCIÓN DE INDIVIDUOS | 28 |
| 5.3 TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS | 28 |
| 5.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN | 28 |
| 5.3.2 PCR ANIDADA | 29 |
| 5.3.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS. | 29 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 31 |
| 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 45 |
| 7.1. CONCLUSIONES | 45 |
| 7.2. RECOMENDACIONES | 45 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Alineación de las secuencias obtenidas | 35 |
| Figura 2. Alineación en cadena de aminoácidos de las secuencias obtenidas y la secuencia de referencia K02120..... | 36 |
| Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas | 36 |
| Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas más secuencias representativas de 7 genotipos diferentes. | 39 |
| Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas diferenciando tipo de genotipo y finca de procedencia | |

¡Error! Marcador no definido.0

GLOSARIO

ADN: sigla de ácido desoxirribonucleico, proteína compleja que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal constituyente del material genético de los seres vivos.

AMINOÁCIDOS: es una molécula orgánica con un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas.

BASES NITROGENADAS: son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno.

FILOGENIA: origen, formación y desarrollo evolutivo general de una especie biológica.

GEN: partícula de material genético que, junto con otras, se halla dispuesta en un orden fijo a lo largo de un cromosoma, y que determina la aparición de los caracteres hereditarios en los seres vivos.

GENÉTICA: parte de la biología que estudia los genes y los mecanismos que regulan la transmisión de los caracteres hereditarios.

GENOTIPO: conjunto de los genes que existen en el núcleo celular de cada individuo.

LEUCOSIS: enfermedad de los órganos productores de la sangre que se caracteriza por la proliferación excesiva de leucocitos o glóbulos blancos en la sangre y en la médula ósea.

PREVALENCIA: es el número de casos de una enfermedad o evento en una población y en un momento dado.

PRUEBA DIAGNÓSTICA: se llamará prueba diagnóstica (PD) a cualquier proceso, más o menos complejo, que pretenda determinar en un paciente la presencia de cierta condición, supuestamente patológica, no susceptible de ser observada directamente (con alguno de los cinco sentidos elementales).

VIRUS: microorganismo compuesto de material genético protegido por un envoltorio proteico, que causa diversas enfermedades introduciéndose como parásito en una célula para reproducirse en ella.

RESUMEN

La leucosis bovina es una enfermedad de gran importancia, por su carácter enzoótico y de fácil transmisión, además de ser una limitante para la exportación de ganado en pie y generar elevadas pérdidas económicas en las fincas lecheras.

En un estudio previo realizado en hatos lecheros del municipio de Pasto, se puso en evidencia la circulación del virus en la región, por lo cual era importante confirmar el diagnóstico mediante una prueba más confiable y evidenciar los genotipos existentes en la región. Para este estudio se tomaron muestras de sangre de los animales positivos a la prueba de ELISA indirecta y de sus hijas, las muestras de sangre se conservaron en tarjetas FTA para posterior extracción de ADN y procesamiento mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Posterior a la confirmación con esta prueba se realizó la secuenciación del gen *env*.

Se obtuvieron 17 secuencias del fragmento del gen *env* del virus de Leucosis Bovina y se construyeron árboles filogenéticos mediante el programa MEGA 6, con el fin de poder comparar las secuencias con secuencias existentes en el GenBank.

Las secuencias de los fragmentos comparados no difieren mayormente de los ya descritos; pero permite su agrupación en diferentes *clusters*, de acuerdo al genotipo encontrado que para este estudio corresponde al genotipo 1 y genotipo 2.

ABSTRACT

Bovine leucosis is a disease of great importance for its enzootic characteristic and easier transmission; it could be an obstacle for the export of cattle and generate high economic losses in dairy farms.

In a previous study in dairy herds of the municipality of Pasto, it allowed to know virus circulation in the region so it was important to confirm the diagnosis with a more reliable test and demonstrate existing genotypes in the region. For this study, blood samples from positive animals (indirect ELISA) and their daughters were taken; they were stored on FTA cards for subsequent DNA extraction and processing test by polymerase chain reaction (PCR). After the confirmation of this test, *env* gene sequencing was performed.

Seventeen sequences of the *env* gene fragment of Bovine leukosis virus were obtained and phylogenetic trees were elaborated by MEGA program 6 in order to compare these sequences with sequences present in the GenBank. The sequences of the fragments compared do not differ from those described; but it allows their grouping into different clusters, according to the genotype found that for this study corresponds to genotype 1 and genotype 2.

Palabras claves: *Gen env, PCR, Virus de Leucosis Bovina*

INTRODUCCIÓN

El Virus de leucosis Bovina (VLB) es un retrovirus de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Deltaretrovirus*, conocido por ser un retrovirus tipo C de distribución mundial, induce linfocitosis persistente y en un determinado número de casos produce tumores linfoides¹. Es una enfermedad infecciosa, crónica, insidiosa del ganado bovino, presentando un bajo porcentaje de enfermos con manifestaciones clínicas², que requiere de un periodo de incubación largo, en general de 3 a 5 años o más y solamente una baja proporción de animales pueden desarrollar tumores (0,1 – 5 %)³.

El VLB genera pérdidas económicas resultantes de animales que mueren a temprana edad, animales muertos con linfomas, descenso en la producción láctea, descarte de canales en plantas de beneficio y de igual manera las barreras internacionales para comercialización de animales vivos y subproductos tales como leche carne semen y embriones, además del incremento en los gastos en medicinas y asistencia veterinaria⁴

Al igual que otros retrovirus complejos el genoma del VLB contiene los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* y los genes reguladores que incluye el Impuesto, Rex, R3 y G4. El gen *env* codifica la envoltura gp51 y las glicoproteínas transmembrana GP30 que son esenciales para conferir la infectividad viral y provocar la neutralización de la respuesta de anticuerpos⁵

En los estudios de infección con VLB se han empleado numerosos métodos diagnósticos como: Seroneutralización (SN), Radioinmunoensayo (RIA), Inmunodifusión (ID), Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA), Western Blot (WB) y PCR. La PCR es una prueba conveniente para detectar ADN

¹ GIUSEPPE, A., FELIZIANI, F., RUTILI, D., MIA, G. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked Immunosorbent assay. En: Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2004. Vol 11. p.147-151.

² RESOAGLI, JUAN P. - JACOBO, ROBERTO A. - STORANI, CARLOS A. CIPOLINI, MARÍA F. - DECO, M. - CORREA, E. Resultados Serológicos de Leucosis Enzootica Bovina en la Zona N.O. en Rodeos de Cría de la Provincia de Corrientes, Argentina. Catedra de enfermedades infecciosas. 1999.

³ GONZÁLEZ, E.T., OLIVA, G.A., VARELA, A., BONZO, E., LICURSI, M., ETCHEVERRIGARAY, M.E. Leucosis enzootica bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. En: *Analecta Veterinaria*, 2001 vol.21, no 2. p. 12-20

⁴ DE SOUZA RAJÃO, D. Efeito da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros. Tesis ,(2008), p.26

⁵ ROLA-ŁUSZCZAK M, PLUTA A, OLECH M, DONNIK I, PETROPAVLOVSKIY M, et al. The Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus Isolates from Eastern Europe and Siberia and Its Impact on Phylogeny. En: PLoS ONE 2013 vol.8 no 3: p. 120-122

proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano”⁶

El objetivo del presente estudio fue diagnosticar y secuenciar un fragmento del gen de la envoltura (*env*) del virus de leucosis bovina mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en vacas lecheras de Pasto, Nariño

⁶ GONZÁLEZ *et al.* Op. Cit, p .18

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

El sector lácteo en el municipio de Pasto constituye una parte muy importante para la economía y competitividad de la región y a pesar de esto los productores carecen de medios adecuados para el diagnóstico de cierto tipo de enfermedades que afectan al ganado bovino, dentro de las cuales se incluye la Leucosis Bovina (LB) por ende se hace necesario realizar estudios que ayuden a identificar el estatus epidemiológico de este tipo de enfermedades y establecer los genotipos circulantes. De esta forma es posible hacer aportes que lleven al mejoramiento de la cadena láctea en la región.

Adicionalmente, en Colombia hasta la fecha no existen estudios similares sobre caracterización y secuenciación de un fragmento del gen *env* del VLB que permita conocer la genotipificación del VLB en el país.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las características del virus de leucosis bovina circulante en las fincas lecheras del municipio de Pasto Nariño?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Diagnosticar y caracterizar un fragmento del gen de la envoltura del virus de leucosis bovina mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en vacas lecheras de Pasto, Nariño

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la eficiencia de la PCR en relación a pruebas convencionales como la ELISA indirecta
- Comparar las secuencias del fragmento del gen de la envoltura *env* del (VLB) obtenidas y secuencias reportadas en el Gen Bank
- Comparar las secuencias del fragmento del gen de la envoltura *env* del (VLB) obtenidas entre sí de acuerdo a la procedencia por predio

4. MARCO TEÓRICO

4.1 ETIOLOGÍA

Según Felmer, et al. La leucosis bovina es una enfermedad causada por un retrovirus exógeno linfotrópico Tipo C perteneciente al género de los *deltaretrovirus* y a la subfamilia *orthoretrovirinae*. Los retrovirus tienen la capacidad de producir una transformación neoplásica a la célula hospedadora y posteriormente linfoma, leucemia o ambas, es capaz de infectar linfocitos T y monocitos, pero afectan principalmente a los linfocitos B⁷.

Andújar afirma que:

El genoma de los retrovirus contiene tres componentes importantes: los genes *gag*, *pol* y *env*. A ellos hay que sumar dos regiones reguladoras - LTR - en los extremos 5' y 3'. Los virus con capacidad de replicarse contienen todas estas regiones, los virus defectivos para la replicación contienen las mismas regiones pero con grandes deleciones de algunos de estos genes estructurales. El gen *gag* codifica tres proteínas que son: de nucleocápside (NC), de la matriz (MA) y de la cápside (CA). Esta última es el componente proteico más importante del virus; la proteína de matriz se dispone por la parte externa de la cápside y contacta con la membrana suprayacente. El gen *pol* codifica tres enzimas: la transcriptasa inversa (RT), una ribonucleasa (PR) y una integrasa (IN). El gen *env* codifica una proteína de superficie (SU) que interacciona con la célula hospedadora, y una proteína transmembrana (TM)⁸.

Las regiones LTR juegan un papel crucial en el ciclo vital del retrovirus. Son responsables de la expresión génica viral y son necesarias para la integración viral en el genoma celular. Las LTR se dividen en tres regiones: U3, R y U5. A U3 se unen una serie de cooperadores que ayudan a regular los niveles de expresión génica del provirus. Esta dependencia de los cooperadores de origen celular hace que muchos retrovirus sean especie específicos. Entre 5' de LTR y el codón de iniciación del gen *gag* hay una secuencia líder y en ella se encuentran tres locus muy importantes como son el lugar de unión del cebador (PBS) donde tiene lugar la unión de un ARNt que sirve de cebador para la transcriptasa inversa; el segundo locus es *env* relacionado con los transcritos del gen *env* y el último locus es de secuencias de empaquetamiento que permite al ARN viral ser reconocido por las proteínas *gag* y poder ser incorporado al virión y ser expulsado de la célula⁹.

⁷ FELMER, R., ZÚÑIGA, J., RECAL. M. Estudio Comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la Leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. En: Arch. Med. Vet. 2006 vol 38, N° 2, p. 12-15

⁸ ANDUJAR, M. Virus y Cancer Biocancer 1. 2004. {En línea}. {17 abril 2014}. Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/247/virus-y-cancer>

⁹ Ibid.

4.2 EPIDEMIOLOGÍA

Galdino de Lima afirma que:

La primera referencia de VLB se remonta a 1861, en un hato del oeste del río Elba en Alemania, pero solo llegó a describirse detalladamente por profesionales en 1916 por Knuth y Volkmann, quienes encontraron una forma tumoral asociada a un incremento en el número de leucocitos sanguíneos concluyendo que se trataba de una enfermedad infecciosa, comprobando la presencia del virus a través de microscopía electrónica, se cree que el virus es originario de la región del mar Báltico en los hatos lecheros explotados de forma intensiva. El VLB fue traído de Europa a las Américas en la primera parte del siglo XX, y regresó a Europa a través de la importación de Holstein Canadiense¹⁰

En Colombia el VLB se identificó por primera vez en 1957 a partir de casos clínicos y de necropsia llegados a centros de diagnóstico veterinario¹¹. En el año de 1978, se reportó un caso de la forma juvenil de la leucosis esporádica en un animal de 21 meses proveniente del municipio de Facatativá, departamento de Cundinamarca¹². En el año siguiente se reportó un caso de la forma adulta de linfosarcoma¹³. Este tipo de hallazgos estimularon a un grupo de investigadores del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para emprender un estudio sistemático de la leucosis bovina enzoótica, que se inició con la normalización de las metodologías de producción de antígeno gp-51¹⁴, el estudio de la prevalencia serológica en la Sabana de Bogotá¹⁵.

¹⁰ GALDINO DE LIMA, P.R. Prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no estado do Pará. Universidade Federal do Pará. 1999. citado por CADAVID, LASCARIO, Impacto del virus de la leucosis bovina en la producción de leche, Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, 2012 pág. 17

¹¹ MARIÑO O.C. Situación de la investigación en leucosis bovina en Colombia. En: Rev. Acovez, 1984 vol 8 No.27, p. 22-26.

¹² LOZANO F., MONTENEGRO G. & LUQUE E. Linfomas (leucemia) bovino, reporte de un caso de la forma juvenil. En: Rev. ICA, 1978 vol. 8 No.1, p. 205-214

¹³ LOZANO F., NEIRA L.R., MARIÑO O.C., SIERRA P. & LUQUE E. Linfomas bovino en Colombia; presentación de la forma adulta de la enfermedad. En : Rev. Acovez, 1979 vol. 3 N.12, p. 29-32.

¹⁴ MARIÑO O.C., NEIRA R, RUEDA E. & LOZANO F. Preparación de antígeno para diagnóstico de la infección por virus de linfomas bovino en Colombia. En: Rev. Acovez, 1980 vol. 5 No 17, p.3-7.

¹⁵ PARRA D., RAVE G. & MARIÑO O.C. Prevalencia serológica de la leucosis bovina en la Sabana de Bogotá durante 1980. En: Rev. ICA, 1982 vol,17, p. 45-50. Citado por: ALFONSO, R., ALMANSA, J.E., & BARRERA, C. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de la leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. *Rev Sic Tech Off Int Epi*. 1998 vol. 17, p. 723-732.

Los primeros análisis epidemiológicos establecieron una prevalencia serológica de 36,4 (+/- 5,2%) para la Sabana de Bogotá en 1980. Dos años más tarde reportaron una prevalencia de 25,9% para la zona Andina¹⁶. Romero et al. En 1999 encontraron prevalencias en ganado de leche de 24.9 % para la región Andina, 14.4 % para la región Caribe y 15.3 % para el Piedemonte Llanero¹⁷. En estudios más recientes como el de Betancour & Rodas en el 2008 en los municipios de Cereté, San Carlos y Momil, se reportó un 15% de seroprevalencia con la técnica de ELISA y un 21% en animales con trastornos reproductivos¹⁸. En un estudio realizado en el municipio de Pasto Serrano, M y Rodríguez, C en el año 2012 encontraron una prevalencia del virus del 19.8% mediante la técnica de ELISA indirecta¹⁹

Según la página web de FEDEGAN entre los años 2005 y 2009 encontraron que los laboratorios del ICA y otros de referencia reportan una prevalencia del 25% en un total de 20.910 muestras procesadas en búsqueda de la enfermedad de todo el país, La leucosis viral bovina es la tercera causa de solicitud diagnóstica en el grupo de enfermedades reproductivas²⁰

4.3 TRANSMISIÓN

4.3.1 Transmisión Horizontal. La infección se transmite fundamentalmente en forma horizontal por exposición de los bovinos susceptibles a los linfocitos “B” portadores del virus. La sangre y la leche son los principales vehículos para la transmisión, esta vía es la principal y se denomina infección postnatal²¹.

Dentro de las causa principales a la exposición de linfocitos B portadores, se encuentra la forma iatrogénica por malas prácticas de manejo veterinario²², como lo es por ejemplo la no desinfección de equipos veterinarios entre un animal a otro en procedimientos como vacunaciones, descornes, castraciones entre otros, la no utilización de mangas obstétricas para palpación o el no cambiarse la manga entre

¹⁶ Ibíd.

¹⁷ ROMERO, J.R., VILLAMIL, L.C., PINTO, J .A . Impacto económico de enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamérica: Estudios de caso, Reino Unido En: Rev. sci. tech. Off. int. Epiz 1999 vol.18,p. 498-511

¹⁸ BETANCUR, H., & RODAS, G. Seroprevalencia de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. En: Rev MVZ Córdoba, 2008 vol.13 N.1, p. 1197-1204.

¹⁹ SERRANO, M. RODRIGUEZ, C. prevalencia del virus de leucosis bovina y formas de presentación de la enfermedad en hatos lecheros del municipio de Pasto, Nariño. 2012. p 5

²⁰ FEDEGAN., Federación Colombiana de Ganaderos. {En línea}. {16 Abril 2015} Disponible en la web:http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1820326&_dad=portal&_schema=PORTA

²¹ RAMA, G.. Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzootica Bovina. Universidad de la república. Montevideo, Uruguay. 2009, p. 40

²² Ibíd.

un animal y otro además de insectos hematófagos, incluso la antigua práctica de la premunición (transfusiones sanguíneas de animales adultos a jóvenes para favorecer la estabilidad enzoótica contra Babesia y Anaplasma). Todo esto ha favorecido a la fácil diseminación de la infección en los hatos lecheros que no cuentan con buenas prácticas de manejo grupal²³

4.3.2 Transmisión vertical. Teóricamente, la transmisión vertical puede ocurrir por la integración del provirus en el ADN de las células germinales (óvulo o espermatozoide)²⁴ Aunque múltiples estudios revelan que no lo han descubierto en semen y embriones completos, los embriones fértiles de vacas positivas a VLB se han transferido sin que se produzca infección del feto; Sin embargo el virus si se ha detectado en semen colectado mediante la técnica del masaje²⁵. Según Galdino de Lima, puede ocurrir transmisión transplacentaria ya que el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria ocasionando infección entre el 13% y 18% de los terneros de vacas infectadas²⁶

Trono y colaboradores mencionan que:

La infección intrauterina ocurre entre el 2 y el 10 % según el rodeo (dependiendo de la susceptibilidad, la línea genética, etc.) y se debe al parecer a la invasión de la placenta y paso a través de esta estructura de linfocitos infectados. La ocurrencia de la infección intrauterina no depende del número de parición, ni del momento de infección de la madre, y ocurre en etapas de la gestación en que el ternero es inmunocompetente (a partir del tercer mes de gestación). Estas infecciones pueden ser detectadas por métodos serológicos o virológicos al momento del nacimiento. Un reciente trabajo de investigación realizado por el Instituto Técnico Argentino pone de manifiesto que alrededor del 10% de los animales provenientes de vacas infectadas nacen infectados, y que no hay progresión hasta los 12 meses de edad. A partir de entonces, el nivel de infección en el rodeo aumenta paulatinamente hasta alcanzar el 24% de animales infectados a los 2 años de edad, y luego se eleva abruptamente al 60% a los 30 meses, coincidiendo con

²³ BETANCUR, H., & RODAS, G. Seroprevalencia de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *En: Rev MVZ Córdoba*, 2008 vol.13, p. 1197-1204.

²⁴ MESZAROS, J., ANTAL, T., POLNER, A., SZABÓ, I., ZENTMIKLÓSSY CS. TEKES, L. Experiencias de la erradicación de la leucosis viral bovina en Hungría. *Magy. Áll. Lapja*, 41, 277-85. Citado por: CADAVID, LASCARIO, Impacto del virus de la leucosis viral bovina en la producción de leche, Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, 2012 pág. 35

²⁵ BLOOD, D.C., & RADOSTITS, O.M. Medicina Veterinaria. Séptima edición. 1992 P. 878-886.

²⁶ GALDINO DE LIMA. Op. Cit.

el ingreso a la lactancia. Esto muestra que el periparto y el ingreso al hato son puntos críticos en la evolución de la infección.²⁷

La transmisión a través de leche o calostro infectado es posible por el paso de linfocitos infectados a través del epitelio de la mucosa intestinal durante las primeras horas de vida. Sin embargo la infección por esta vía, al parecer, ocurre muy rara vez, posiblemente debido a la existencia de anticuerpos maternos en la leche o calostro que también son absorbidos por el ternero²⁸. Parece ser que solo vacas con anticuerpos virales para el antígeno nuclear p24 del virus o linfocitosis persistente transmiten el virus por esta ruta²⁹

4.4 PATOGENIA

Gillet; N, et al mencionan que:

Posterior a la llegada del virus a un individuo susceptible mediante células de un individuo infectado, las cuales contienen el genoma viral. Estas células alogénicas contenidas en sangre, semen o leche cruda infectan las células del nuevo hospedero. Una vez ingresado al organismo el objetivo del virus son los linfocitos B que expresan la IgM. La infección viral es seguida por una expansión policlonal de una gran y diversa población de linfocitos portadores de uno a cinco provirus integrados³⁰.

Durante el primer mes post infección las células infectadas son detectables en sangre alrededor de las 2 semanas, alcanzan un pico en la tercer semana y luego decrecen rápidamente, lo que sugiere que el virus está entrando a nuevas células huésped en otros tejidos³¹, lo que ocurre inmediatamente después no está del todo claro. La primera indicación de la infección es la aparición de la respuesta inmune humoral dentro de las 8 semanas post inoculación. Los anticuerpos reconocen epitopes de gp51 y p24 y son líticos para las células productoras del virus. Casi al mismo tiempo de la seroconversión temprana aparecen linfocitos T

²⁷ TRONO, K., PEREZ-FILGUEIRA, D.M. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitive and specificity of different detection methods. *Veterinary Microbiology* 2011 vol. 83,p. 235-248.

²⁸ CAÑIBANO, E.. Leucosis Enzootica Bovina. Facultad de ciencias veterinarias, Tandil 2011.p. 30.

²⁹ Digiacomo, R.F. (1992a). The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Vet Med*, 87:248-257.

³⁰ GILLET; N.; FLORINS; A.; BOXUS; M.; BURTEAU; C.; NIGRO; A.; VANDERMEERS; F.; BALON; H.; BOUZAR; A.B.; DEFOICHE; J.; BURNY; A.; REICHERT; M.; KETTMANN; R.; WILLEMS; L.. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel antiretroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007,p. 4-18

³¹ FULTON; JR.; B. E.; PORTELLA; M.; RADKE; K.. Dissemination of Bovine Leukemia Virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node. *En: Journal of Virology* 2006 vol.80 N.16,p. 7873–7884.

citotóxicos para los epitopes *tax* y *env* en sangre periférica. Esta respuesta persiste y se amplifica durante la vida del animal, indicando que el sistema inmune es estimulado permanentemente por el virus³². El aumento de la carga viral en el animal infectado ocurre por el ciclo replicativo normal del virus, y también por la mitosis de las células huésped infectadas, en un proceso conocido como expansión clonal³³

Patogenia de la linfocitosis, en los bovinos la linfocitosis no se debe a un aumento de la producción de los linfocitos B, sino a una disminución en la tasa de recambio de los mismos, debido a la reducción de la apoptosis, la cual es inhibida de alguna manera por la acción del virus³⁴.

Patogenia de los tumores: en el comienzo del período de cronicidad de la enfermedad el genoma de la célula huésped evidencia modificaciones genéticas: hiperdiploidía, pequeños cromosomas adicionales, trisomías, traslocaciones y reacomodamientos isocromáticos³⁵

El perfil genético del genoma del hospedero predispone el desarrollo de los tumores. El factor más importante en la progresión clínica de la enfermedad es el complejo mayor de histocompatibilidad. Los tumores se producen a causa de la infiltración de linfocitos B transformados que se acumulan en tejidos tales como hígado, corazón, ojos, piel, pulmones y nódulos linfáticos³⁶.

4.5 SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas se aprecian mayoritariamente después de los 2 años de edad y el periodo de mayor frecuencia es entre los 5 y 8 años. En estudios realizados en ganado lechero, la mayor frecuencia de presentación del linfosarcoma fue entre las edades de 6 a 10 años³⁷

La mayoría de los síntomas son inespecíficos y variables, puesto que van a responder a la ubicación de las formaciones neoplásicas y según el grado de afectación de los órganos. Se ha descrito anemia, emaciación e infertilidad.

³² GILLET; N, et al.op cit.

³³ BARUTA, D.A.; ARDOINO, S.M.; BRANDAN, J.L.; SOSA, R.E.1; MARIANI, E. L. ; ALBRETCH, E.M., Leucosis bovina enzoótica, ciencia veterinaria. 2011, vol 13 no 1, ISSN 1515-1883,p. 11

³⁴ *Ibíd.* P. 12

³⁵ DEQUIEDT, F.; HANON, E.; KERKHOFS, P.; PASTORET, P.P.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Both wild-type and strongly attenuated bovine leukemia viruses protect peripheral blood mononuclear cells from apoptosis. En: J Virol. 1997 vol.71,p.630-639

³⁶ GILLET; N, et al.op cit.

³⁷ CHAMIZO PESTANA, E.G. Leucosis Bovina Enzoótica. En: Patología Orgánica y Enfermedades de los Animales Domésticos.1997. 1º Ed. Félix Varela, La Habana. P. 209.

También se han reportado momificaciones por tumoraciones en las paredes del útero y cuernos uterinos. El signo más frecuente que lleva a pensar en la enfermedad es el agrandamiento bilateral y más o menos simétrico de los nódulos linfáticos explorables³⁸. Incluso Chamizo Pestaña en el 2005 reporto nódulos linfáticos pre-escapulares que llegaron a pesar 1.8 kilos³⁹. La exoftalmia por degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, es bastante específico como signo de la enfermedad⁴⁰. La presencia de deformaciones o masas tumorales subcutáneas en varias partes del cuerpo, también es indicativo de la enfermedad.

Una proporción variable de animales infectados estimada en el 30% desarrolla linfocitosis persistente siendo una proliferación no neoplásica⁴¹. La mayor parte de las células involucradas son morfológicamente linfocitos normales, aunque también se han descrito células atípicas y anormales, lo cual se ha considerado como indicativo de un estado pre-leucémico. El incremento en el conteo de linfocitos, corresponde con el incremento en los linfocitos B⁴²

Hematológicamente se debe distinguir leucemia de linfocitosis persistente. La leucemia hace referencia a la presencia de células tumorales o anormales detectadas en la corriente sanguínea indicando transformación neoplásica de la médula ósea y presencia de linfosarcoma⁴³. Estas células neoplásicas en sangre aparecen entre 5 – 10 % de los casos de linfosarcoma y se conocen como prolinfocitos, células de Rieder, linfoblastos, paralinfoblastos, aunque solo los dos últimos tipos son asociados a figuras de mitosis pueden ser de significación diagnóstica en leucemia⁴⁴.

Según Chamizo en 2005:

El Linfosarcoma. Es común en adultos de más de cuatro años, se observa el agrandamiento de los linfonodos, se presenta taquicardia, pulso yugular

³⁸ SCHELL; M.; HECKERT H.P.; MULLER; K.E.. Case report : lymphosarcoma in a cow. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2004, vol. 111, p. 38-41.

³⁹ CHAMIZO PESTANA, E.G. Leucosis bovina enzoótica - Revisión. En: Revista Electrónica Veterinaria Vol. 7 p. 1-25.

⁴⁰ MALATESTINIC A. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma.. Can Vet J. 2003 vol. 44No 8 p. 664-666.

⁴¹ HAMILTON, V.T.; STONE, D.M.; CANTOR, G.H.. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. Virology 2003 vol. 315,p.135-47.

⁴² BEYER, J. ; KÖLLNER, B. ; TEIFKE, J.P. ; STARICK, E. ; BEIER, D. ; REIMANN, I. ; GRUNWALD, U. ; ZILLER, M. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. En :Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. Vol.49 N. 6, p.270-277.

⁴³ BARUTA, D.A. et al. Op cit. p 12

⁴⁴ Ibíd.

positivo, timpanismo ruminal con reflujo abomasal, indigestión, diarrea, exoftalmos, mucosas pálidas, heces oscuras y malolientes, tumoraciones en útero, vagina y región perivaginal, disminución paulatina de la producción de leche hasta el cese total, disminución de parámetros reproductivos, disminución progresiva de la condición corporal, finalizando con la muerte del animal⁴⁵

Las formas de presentación en los terneros, tímica y cutánea son denominadas Leucosis bovina esporádica. Los síntomas clínicos del linfosarcoma del ternero incluyen pérdida gradual de peso, aumento generalizado y súbito del tamaño de los nódulos linfáticos y debilidad; fiebre, taquicardia y paresia posterior son síntomas menos frecuentes. La muerte se produce entre los dos a ocho meses. Igualmente síntomas como presión en órganos internos por las masas tumorales e insuficiencia cardíaca. Asimismo se ha descrito necrosis del hueso y médula ósea, con debilidad e inactividad, ataxia posterior, aumento de nódulos linfáticos, cojeras y disnea asociadas⁴⁶

El linfosarcoma tímico es un hallazgo frecuente en animales de 1-2 años de edad y se caracteriza por aumento masivo del timo en el área de la papada y lesiones en la médula ósea y nódulos linfáticos. También son frecuentes la congestión de la vena yugular y el edema marcado de la papada y la región submandibular, puede aparecer un timpanismo moderado a causa de la incapacidad para eructar debido a compresión esofágica por ganglios mediastínicos de la cavidad torácica, las masas tímicas normalmente no son palpables. La forma tímica es más común en ganado tipo carne que en ganado tipo leche⁴⁷. De otra parte la forma cutánea es más común en ganado vacuno de 1-3 años de edad, siendo rara y manifestándose por placas en la piel de 1-5 cm de diámetro que se harán presentes en cuello, parte posterior de los muslos y la grupa; estas placas pueden desaparecer espontáneamente y transcurridos 1-2 años reaparecer y expresar afectación de órganos internos⁴⁸.

4.6 LESIONES

La principal afección se encuentra localizada en los nódulos linfáticos describiéndose como generalizada (76 a 100 %), diseminada (26 a 75 %) y localizada (1 a 25 %). Los nódulos más afectados son los ilíacos, seguidos de los

⁴⁵ CHAMIZO PESTANA, 2005. Op cit.

⁴⁶ KAHN, B.A. Manual Merck de Veterinaria. Sexta edición. 2007, p. 581-585.

⁴⁷ BLOOD, D.C., & RADOSTITS, O.M. (1992). Medicina Veterinaria. Séptima edición. P. 878-886.

⁴⁸ KAHN, B.A, op cit.p 582

intratorácicos y mesentéricos, y con menor frecuencia los preescapulares, precruales y de la región cervical⁴⁹.

Los nódulos aparecen aumentados de tamaño; externamente su aspecto es liso o nodular, sin adherencias con los tejidos circundantes, su consistencia puede ser blanda o edematosa o bien firme, turgente y friable. Al corte se pierden los detalles de la estructura anatómica por infiltración de tejido lardáceo. En algunos casos se pueden observar hemorragias o pequeños focos de necrosis de color amarillento⁵⁰.

La médula ósea puede aparecer infiltrada por un tejido color blanco grisáceo reemplazando el color rojo normal que se observa en la médula hematopoyética. La afección tumoral de la médula ósea implica la presencia de leucemia, o sea aparición de células tumorales en la corriente sanguínea⁵¹.

Chamizo Pestana, menciona que:

El bazo puede presentar un ligero aumento de tamaño o una esplenomegalia tumoral; la superficie de corte seca y con nódulos blanquecinos diseminados por todo el parénquima. En el corazón pueden aparecer nódulos o áreas infiltrativas, difusas de color blanquecino, el espesor de las paredes uterinas puede estar engrosado por la aparición de tejido lardáceo de color blanco grisáceo, El abomaso aparece infiltrado por tejido tumoral, incrementando el grosor de su pared y en algunas ocasiones presencia de úlceras. En el intestino se encuentran lesiones similares con mayor predisposición de úlceras en la mucosa. En riñones aparecen lesiones infiltrativas que producen hemorragias en la superficie del órgano, o bien nódulos que resultan en atrofia del parénquima renal además puede verse afectado el tejido retro-ocular y provocar con su crecimiento protrusión del globo ocular o exoftalmo y se ha observado infiltración tumoral de la córnea y la aparición del tumor en la cámara anterior del ojo, La afección hepática es más significativa en los animales adultos que en los jóvenes, con un aumento de tamaño, consistencia blanda, y coloración pálida difusa del órgano. En el pulmón las lesiones son raras, pudiéndose presentar en la forma infiltrativa, difusa y nodular⁵²

⁴⁹ BARUTA, D.A. et al. Op cit. p 13

⁵⁰ CHAMIZO, P. 1997, op cit.

⁵¹ FERRER, J.F.; MARSHAK, R.R.; ABT, D.A.; KENYON, S.J.. Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. En: Ann Rech Vet. 1978 vol.9, N.4, p.851-857.

⁵² CHAMIZO, P. 1997, op cit.

4.7 DIAGNÓSTICO

El 30% de los bovinos infectados desarrollaran linfocitosis persistentes (LP), y entre el 2 y 10% linfosarcoma (LFS). En consecuencia, una primera aproximación diagnóstica puede hacerse a través de la sintomatología clínica en bovinos con linfosarcoma⁵³. EL Linfosarcoma se diagnostica por el examen clínico y se confirma histopatológicamente en biopsias de los tumores. “La linfocitosis persistente se diagnostica mediante exámenes hematológicos periódicos que demuestren la persistencia de la linfocitosis por al menos 3 meses”⁵⁴.

En los estudios de infección con VLB se han empleado numerosos métodos diagnósticos tales como: seroneutralización (SN), radioinmunoensayo (RIA), inmunodifusión (ID), Elisa indirecta (ELISA), Western Blot (WB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁵⁵.

En varios países existen programas oficiales para el control y erradicación del VLB. El diagnóstico se realiza rutinariamente por métodos serológicos. Los anticuerpos que primero se detectan son los dirigidos contra gp51 y p24 del virus. La mayor parte de las pruebas rutinarias como ID y ELISA detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, que son de aparición temprana. Se han descrito métodos para realizar estas pruebas⁵⁶. La ID ha sido por muchos años la prueba de elección por su alta especificidad y aceptable sensibilidad. Recientemente se desarrollaron distintos equipos comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche⁵⁷

PCR es una prueba conveniente para detectar DNA proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano⁵⁸. El método más sensible y rápido es la PCR doble (anidada) seguida por electroforesis y tinción. El método descrito se basa en secuencias cebadoras del gen *env*, que codifica la gp51. Este gen está

⁵³ CADAVID, LASCARIO. Op cit. p 37

⁵⁴ GIRAUDO, J., BÉRGAMO, E., SCHNEIDER, M., MAGNANO, G., MACIAS, A., STICOTTI, E., & MACIÓ., MAURO. Leucosis Enzootica Bovina. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 2010 {en línea}. {16 de abril 2015}. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar

⁵⁵ GONZÁLEZ *et al.* Op. Cit. p .18

⁵⁶ BARUTA, D.A. et al. Op cit. p 13

⁵⁷ GONZÁLEZ et al. Op. Cit. p .18

⁵⁸ Ibíd

muy conservado, y tanto el gen como el antígeno están generalmente presentes en todos los animales infectados a lo largo de las fases de la infección⁵⁹.

⁵⁹ OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2012. 6Th Edition. Chapter 2.4.11. Enzootic Bovine Leukosis. 729-738 (27/04/2015) disponible: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 TIPO Y LUGAR DE ESTUDIO

Se realizó un estudio epidemiológico de tipo descriptivo en las fincas lecheras diagnosticadas previamente mediante la prueba de ELISA indirecta en el año 2012, las 3 fincas se ubican en el municipio de Pasto, departamento de Nariño, ubicado sobre 2500 msnm hasta los 3200 msnm donde generalmente se encuentran los hatos lecheros.

5.2 SELECCIÓN DE INDIVIDUOS

Se seleccionaron todos los animales positivos al VLB mediante la prueba ELISA indirecta y su progenie. Se tomaron muestras de un total de 31 animales positivos de las cuales 18 muestras corresponden a vacas madres y 13 pertenecientes a las hijas.

5.3 TOMA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de sangre fueron tomadas de acuerdo a estándares de bienestar animal para evitar un estrés innecesario al animal y siguiendo el protocolo para toma de muestras sanguíneas con medidas de bioseguridad y asepsia necesarias.

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena coccígea por medio de una jeringa desechable de 3 ml y una aguja hipodérmica calibre 20 para cada animal. Posterior a la extracción, se descartaron las primeras tres gotas de sangre de la jeringa e inmediatamente se depositó una gota de sangre en la región demarcada de cada tarjeta FTA previamente identificada para cada animal. Cada una de las tarjetas FTA fue envuelta en papel aluminio para ser almacenada hasta su procesamiento.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de virología de la universidad central de Tandil, Argentina y la secuenciación en el INTA de Buenos Aires, Argentina

5.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN. El ADN se obtuvo de acuerdo con el protocolo Whatman®, Se cortó un disco seco del punto de muestra de (3 mm). El disco se transfirió a un tubo de (1.5ml) para continuar con la purificación del ADN, se lavó con 500µL de reagente (FTA® Purification reagent) por agitación 3 veces durante 5 segundos El disco se transfirió a un nuevo tubo de 0,5 ml que contiene 30µL reagente, asegurando que el disco está completamente sumergido, y se incubó a 95 ° C durante 15 a 30 min. El tubo se agitó con vórtex de pulso. Después de eso,

se centrifugó durante 30 segundos para separar el ADN purificado. El sobrenadante se refrigeró hasta su proceso. 25 ul de solución se utilizaron en cada reacción de PCR.

5.3.2 PCR ANIDADA. Con el fin de confirmar el ganado seropositivo se realizó una prueba de PCR anidada, de acuerdo con los protocolos de laboratorio virológica en la Universidad Nacional del Centro:

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando Master Mix1 (24µL) y 5 µl de ADN, recuperado de cada filtro de disco. Se inició con una etapa de incubación en un termociclador de ADN (Veriti Invitrogen) a 94°C durante 5 min seguido por 35 ciclos, de desnaturalización a 95°C durante 30s, hibridación a 62°C durante 30s y etapa de extensión a 72°C durante 30s (cebadores externos, env5032 5' TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3', 5'-env5608 AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3 '). Una alícuota de 1 ul del producto amplificado se transfirió directamente a un nuevo tubo de mezcla fresca para la segunda ronda de amplificación, en las mismas condiciones, pero la temperatura de incubación fue 70C (cebadores env5521r interna (5'-3'-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG, env5608r 5'-3'-AACAACAACCTCTGGGAAGGGT), esto fue seguido por una extensión final a 72°C durante 10 min

Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 0,9% en tampón TBE 0,5x por tinción con bromuro de etidio.

La secuenciación directa de un fragmento de gen *env* de 444 pb se realizó en el equipo ABI377 Genetic Analyzer en el laboratorio INTA

5.3.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS. Para realizar el análisis de las secuencias se trabajó con la mayor cantidad de secuencias con mínimo 331 pb obteniendo 17 secuencias pertenecientes a tres predios diferentes, se descartaron 14 secuencias que no alcanzaron a tener el mínimo de 331 pb.

Utilizando el programa Mega en su versión 6 que es un software de genética molecular ampliamente utilizado, dentro del cual se encuentra el programa clustal w se realizó la corrección y alineación de las secuencias obtenidas además la construcción de árboles filogenéticos. (Imagen 1, imagen 3 respectivamente)

Para obtener información sobre los cambios de aminoácidos que codifican la proteína gp51 en las secuencias del VLB aisladas en las fincas de Pasto Nariño, las secuencias de *env* gp51 en esta región fueron alineados junto con la secuencia

de referencia K02120⁶⁰ utilizando el programa Clustal W y se tradujeron a las secuencias de aminoácidos utilizando el programa MEGA 6 (imagen 2)

Para realizar la clasificación dentro de los diferentes genotipos existentes estas secuencias fueron alineadas con secuencias aisladas en diferentes Países del mundo, en representación de 7 genotipos del VLB reportadas en el Gen Bank para un total de 83 secuencias. Una vez alineadas, se trabajó mediante un análisis de NJ construyendo un árbol filogenético usando el programa MEGA 6. El resultado se muestra en la imagen 4

Por último se realizó una comparación y análisis de las secuencias obtenidas de acuerdo al tipo de genotipo y procedencia por finca. Imagen 5.

⁶⁰ SAGATA,N., YASUNAGA,T., TSUZUKU-KAWAMURA,J., OHISHI,K., OGAWA,Y. AND IKAWA,Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985 vol. 82 (3), p. 677-681

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el diagnóstico del VLB mediante PCR, se encontró que se confirmaron 27 animales de los 31 animales positivos a la prueba de ELISA indirecta. Cuatro de los animales diagnosticados como positivos a la prueba de ELISA fueron negativos a la prueba de PCR encontrando un valor del 13% de falsos positivos.

En algunas ocasiones el fracaso de la detección de anticuerpos por métodos serológicos estándar se debe a la variabilidad de los genotipos del VLB que pueden dar lugar a diferencias antigénicas y podrían afectar a la identificación serológica del virus en las poblaciones de ganado infectado de diferentes áreas geográficas⁶¹. De hecho, se ha demostrado que la sensibilidad y la especificidad de diferentes métodos de ensayo serológicos ya demuestran una variación significativa⁶². Sin embargo, otros estudios informaron que no existe una correlación entre el genotipo VLB y el estado serológico de animales infectados, proponiendo que la diferencia en la respuesta inmune antiviral puede estar relacionado con la etapa de la infección y otros factores del hospedero⁶³.

El inconveniente de la prueba ELISA respecto a los falsos negativos, se puede atribuir a la débil respuesta inmune humoral y la baja sensibilidad de esta técnica. Tal como se describe en la literatura, es posible que el ELISA puede dar falsos positivos, donde la determinación-PCR es altamente específico y se pueden producir resultados diferentes en comparación con los métodos serológicos⁶⁴.

La filogenética computacional o la aplicación de algoritmos computacionales, en métodos y programas de análisis filogenético, consiste en construir un árbol filogenético que represente una hipótesis evolutiva de un conjunto de genes, especies u otros taxones.

La filogenética tradicional usaba datos morfológicos obtenidos mediante la medición y cuantificación de las propiedades fenotípicas de los organismos representativos, mientras que los más recientes campos en filogenética molecular

⁶¹ FECHNER, H., BLANKENSTEIN, P., LOOMAN, A. C., ELWERT, J., GEUE, L., ALBRECHT, C., & EBNER, D. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, 1997. 237(2), p. 261-269.

⁶² *Ibíd*

⁶³ LICURSI M, INOSHIMA Y, WU D et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus*. 2002. Res 86, p. 101–110

⁶⁴ MONTI G, FRANKENA K, ENGEL B, BUIST W, TARABLA H, M. DE JONG M. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. *En: J Vet Diagn Invest*. 2005. Vol. 17,p. 451–457

usan secuencias de nucleótidos que codifican genes o secuencias de aminoácidos que forman proteínas como bases de la clasificación. Muchas formas de filogenética molecular están muy relacionadas y hacen un uso extensivo del alineamiento de secuencias en la construcción y redefinición de los árboles filogenéticos usados para la clasificación de las relaciones evolutivas entre los genes homólogos existentes en los genomas de especies divergentes.

La distancia entre dos secuencias se obtiene como la fracción de posiciones en las que existe una diferencia de nucleótidos o aminoácidos⁶⁵. Por lo que la distancia observada puede no corresponderse con la distancia real. También existe la posibilidad de que en una posición ocurra la reversión al estado ancestral o que se dé la misma mutación en las dos secuencias comparadas; en ambos casos se supondría una ausencia de cambio. Cuanto menos relacionadas filogenéticamente estén las secuencias, más probabilidad existirá de que hayan ocurrido eventos de sustitución múltiple, ya que han contado con más tiempo para acumular cambios.

Neighbor-joining, es un método basado en el criterio de mínima evolución (BME: *balanced minimum evolution*), en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas. Para ello, a partir de un árbol en estrella, se determina la pareja de secuencias más cercanas y se unen mediante un nodo interno. Este proceso se repite con el resto de secuencias hasta que quedan todas unidas por nodos internos que minimizan la longitud de cada una de las ramas internas⁶⁶

De los animales analizados, se obtuvieron 17 secuencias de un fragmento del gen *env* de 331 pb de las cuales 9 secuencias pertenecen a vacas madres y 8 secuencias pertenecen a sus hijas. Ordenados de la siguiente manera:

#13523-1B-5099 (Hija)

```
TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA  
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTGCGATCATCAGATTTTATTCCTG  
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC  
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA  
GCTGAACAGTGA CTGGGTTCCCTCTGT CAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC  
GGCACGGGCCTTCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC
```

#13526-5B-5099 (Hija)

⁶⁵ LEMEY P, SALEMI M, VANDAMME, A-M. The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. *Cambridge University Press*. 2009 vol. 23, p. 56-59

⁶⁶ *Ibid.*

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCGATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA
GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13528-7B-5099 (Hija)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCGATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA
GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13530-9B-5099 (Hija)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCGATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA
GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13531-10B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTTAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13532-11B-5099 (Hija)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTTAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13533-12B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCGATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA

GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13534-13B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTGTCGATCATCAGATTTTATTCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA
GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13535-14B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13536-15B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTGTCGATCATCAGATTTTATTCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA
GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13539-18B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13540-19B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTGTCGATCATCAGATTTTATTCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA
GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13541-20B-5099 (Hija)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAACCTGGGAAATATGGGGATATGACC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCTCA
GCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAGAC
GGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13543-24B-5099 (Hija)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13544-25B-5099 (Hija)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13546-27B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

#13547-29B-5099 (Madre)

TGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGA
CAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTG
CATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATC
CCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCA
GTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACA
GCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCC

Al realizar la alineación y comparación entre las secuencias encontradas, se observó pequeñas diferencias en determinadas pares de bases (pb), figura 1.

```

13523-1B-5099 T G C G A G C C C G A T G C C C T T A T G T G G G G G C A G A T C G C T T C G A C T G C C C C C A C T G G G A C A A T G C C T C C C A G G C C G A T C A
13526-6B-5099
13528-7B-5099
13530-9B-5099
13531-10B-5099
13532-11B-5099
13533-12B-5099
13534-13B-5099
13535-14B-5099
13536-15B-5099
13539-18B-5099
13540-19B-5099
13541-20B-5099
13543-24B-5099
13544-25B-5099
13546-27B-5099
13547-29B-5099
13523-1B-5099 G G A T C C T T T T A T G T C G A T C A T C A G A T T T T A T T C C T G C A T C T C A A A C A A T G T C A T G G A A T T T T C A C T T T A A C C T G G G A
13526-6B-5099
13528-7B-5099
13530-9B-5099
13531-10B-5099 . . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . . .
13532-11B-5099 . . . . . A . . . . . T . . . . . C . . . . .
13533-12B-5099
13534-13B-5099
13535-14B-5099 . . . . . A . . . . . C . . . . .
13536-15B-5099
13539-18B-5099 . . . . . A . . . . . C . . . . .
13540-19B-5099
13541-20B-5099
13543-24B-5099 . . . . . A . . . . . C . . . . .
13544-25B-5099 . . . . . A . . . . . C . . . . .
13546-27B-5099 . . . . . A . . . . . C . . . . .
13547-29B-5099 . . . . . A . . . . . C . . . . .
13523-1B-5099 A T A T G G G G A T A T G A C C C C C T G A T C A C C T T T T C T T T A C A T A A G A T C C C T G A T C C C C C T C A A C C C G A C T T C C C C T C A G C T
13526-6B-5099
13528-7B-5099
13530-9B-5099
13531-10B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .
13532-11B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .
13533-12B-5099
13534-13B-5099
13535-14B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .
13536-15B-5099
13539-18B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .
13540-19B-5099
13541-20B-5099
13543-24B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .
13544-25B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .
13546-27B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .
13547-29B-5099 . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . . T . . . . .

```


| gi210767 gb K02120.1 BLVCG Bovine leukemia virus complete genome | D | W | V | P | S | V | R | S | W | A | L | L | L | N | Q | T | A | R | A | F | P | D | C | A | I | C | W | E | P | S |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13523-1B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13526-5B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13528-7B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13530-9B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13531-10B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13532-11B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13533-12B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13534-13B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13535-14B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13536-15B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13539-18B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13540-19B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13541-20B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13543-24B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13544-25B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13546-27B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 13547-29B-5099 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

Figura 2: alineación en cadena de aminoácidos de las secuencias obtenidas y la secuencia de referencia K02120⁶⁷

Se observa sustitución de asparagina (N) por ácido aspártico (D) en 9 de las secuencias aisladas en Pasto Nariño en comparación con la secuencia de referencia K02120⁶⁸

Estas diferencias encontradas en los nucleótidos y aminoácidos de las secuencias obtenidas hacen agruparlas filogenéticamente en dos grupos diferentes (Imagen 3)

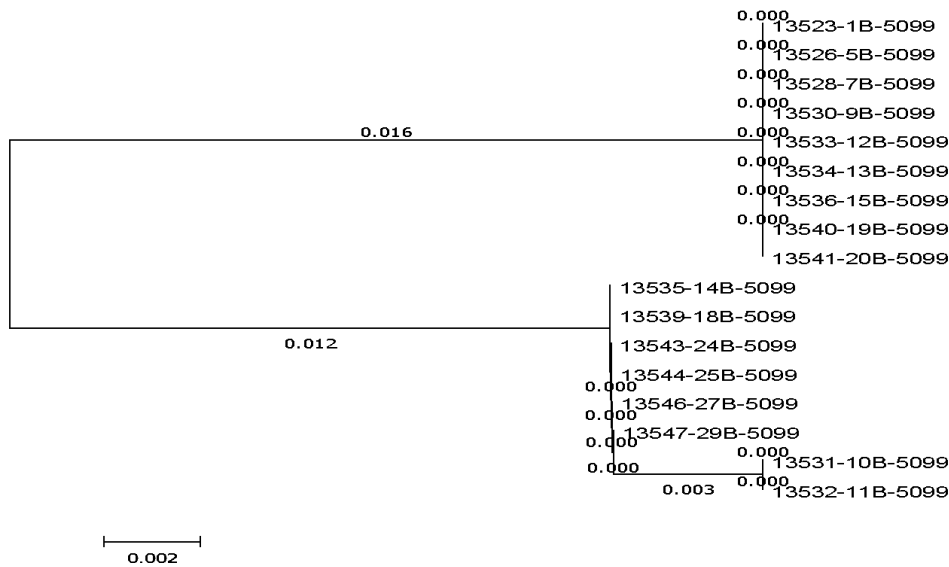


Imagen 3: árbol filogenético de las secuencias obtenidas.

⁶⁷ SAGATA,N., YASUNAGA,T., TSUZUKU-KAWAMURA,J., OHISHI,K., OGAWA,Y. AND IKAWA,Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985 vol.82 (3), p. 677-681

⁶⁸ Ibid.

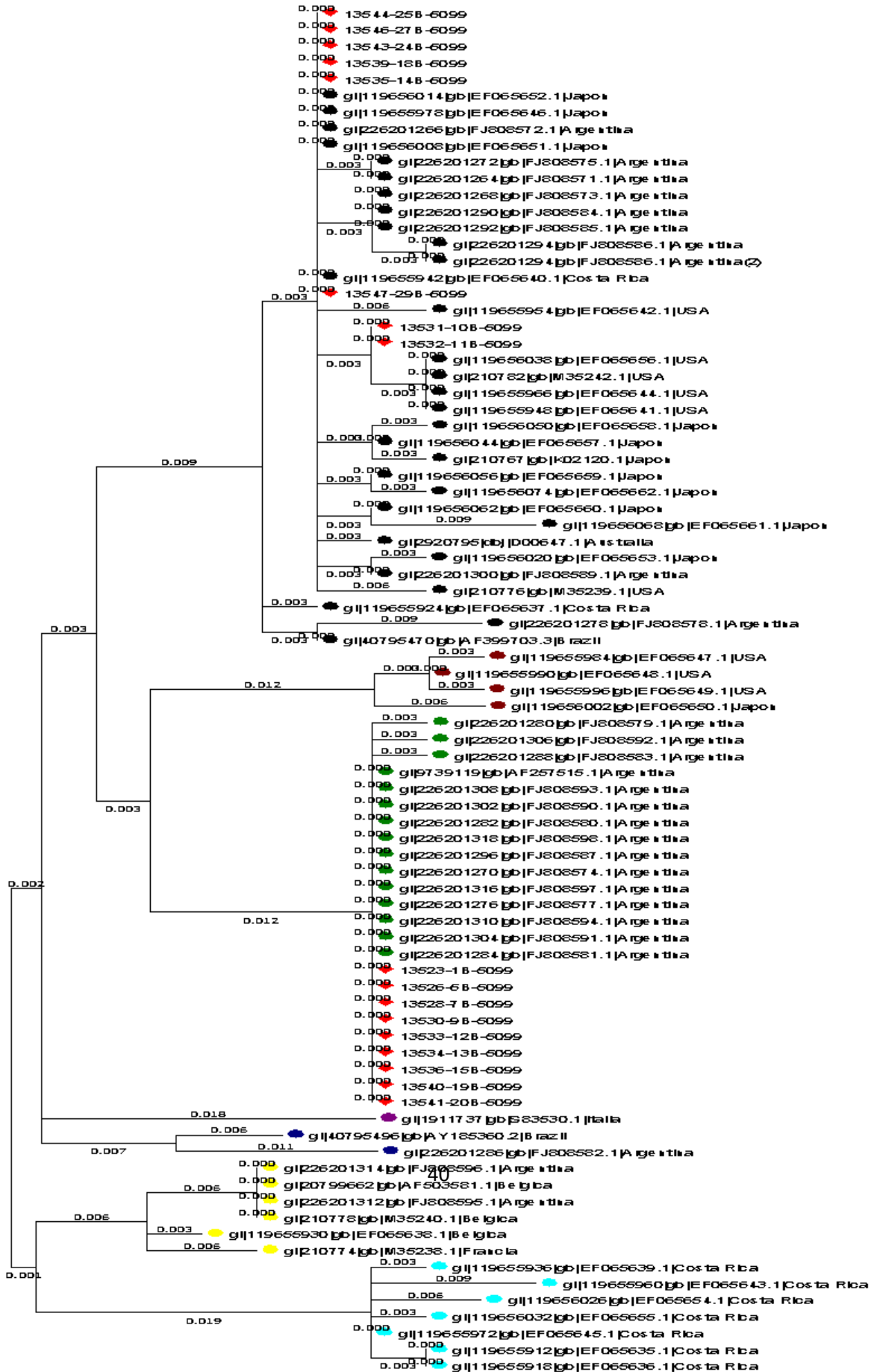
La historia evolutiva se infiere utilizando el método Neighbor-joining⁶⁹. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.03099057. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama (próximos a las ramas) en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad compuesta máxima⁷⁰ y se encuentran en las unidades de la serie de sustituciones de bases por sitio. El análisis incluyó 17 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen lagunas y los datos faltantes fueron eliminados. Hubo un total de 331 posiciones en el último conjunto de datos. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA6⁷¹.

Al realizar la comparación con secuencias aisladas representantes de 7 genotipos distintos se encontró que las secuencias obtenidas en el estudio fueron agrupadas dentro de dos grupos de genotipos diferentes (genotipo 1 y genotipo 2) (Imagen 4)

69 SAITOU Y NEI N. M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. En: Molecular Biology and Evolution 1987 vol.4, p. 406-425.

70 TAMURA, M. NEI AND KUMAR S. Prospects for very large phylogenies inferred using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 2004 vol.101 p. 11030-11035.

⁷¹ TAMURA, STECHER G., D. PETERSON, FILIPSKI A., AND S. KUMAR (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. 2725-2729: Molecular Biology and Evolution 30.



0.005

- ▲ Cepas asiladas en Pasto Nariño.
- Cepas representantes del genotipo 1
- Cepas representantes del genotipo 2
- Cepas representantes del genotipo 3
- Cepas representantes del genotipo 4
- Cepas representantes del genotipo 5
- Cepas representantes del genotipo 6
- Cepas representantes del genotipo 7

Figura 4: árbol filogenético de las secuencias obtenidas más secuencias representativas de 7 genotipos diferentes.

En otros países, se han obtenido resultados similares. En Irán, sólo el genotipo 1 fue encontrado⁷². En 2010, el genotipo 1 se identificó y se encontró que fue el genotipo más frecuente en Japón⁷³. En Jordania, se identificaron el genotipo 1 y el genotipo 6⁷⁴. En Sur América; los siete genotipos del BLV se han detectado, en Uruguay el genotipo 1, en Argentina, tres genotipos diferentes circulan (1, 2 y 4)⁷⁵. En Brasil, al menos cuatro genotipos diferentes (1, 5, 6 y 7)⁷⁶, aunque el genotipo 1 es el de mayor prevalencia⁷⁷. Se puede observar que el genotipo 1 se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, pero el genotipo 2 es más común en los países de Sudamérica como Argentina y Colombia.

Las secuencias del gen env del VLB han sido clasificadas entre dos y cuatro agrupaciones genéticas en diferentes ubicaciones alrededor del mundo. Algunos

⁷² . HEMMATZADEH F. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukaemia virus in Iranian isolates. En: Vet Res Commun. 2007. Vol. 31,p. 783–789

⁷³ MATSUMURA K, INOUE E, OSAWA Y, OKAZAKI K. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. Virus Res. 2011. Vol. 155,p. 343–348

⁷⁴ Ababneh, M. M., Al-Rukibat, R. K., Hananeh, W. M., Nasar, A. T., & Al-Zghoul, M. B. Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. Arch of Virol, 2012. 157(12), 2343-2348.

⁷⁵ RODRIGUEZ SM, GOLEMBA MD, CAMPOS RH, TRONO K, JONES LR. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. En: J Gen Virol. 2009. Vol. 90,p.2788–2797

⁷⁶ CAMARGOS MF, PEREDA A, STANCEK D, ROCHA MA, REIS JK, GREISER-WILKE I, LEITE RC. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukaemia virus. Virus Genes. 2007. Vol. 34,p. 343–350

⁷⁷ ABABNEH, et al. Op cit.

de estos grupos parecen correlacionarse con el origen geográfico de la muestra
78,79,80,81

La presencia de más de un solo genotipo del VLB en diferentes áreas geográficas del mundo puede explicarse por modernas tendencias de negociación del ganado^{82,83}

Teniendo en cuenta la procedencia por fincas de las secuencias, la agrupación filogenética muestra que el genotipo 1 fue encontrado en todas las fincas muestreadas y que en dos de ellas existe la presencia de dos genotipos diferentes (genotipo 1 y genotipo 2) (Imagen 5)

⁷⁸ ZAHO X, BUEHRING G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology* .2007. vol. 360, p. 150–165.

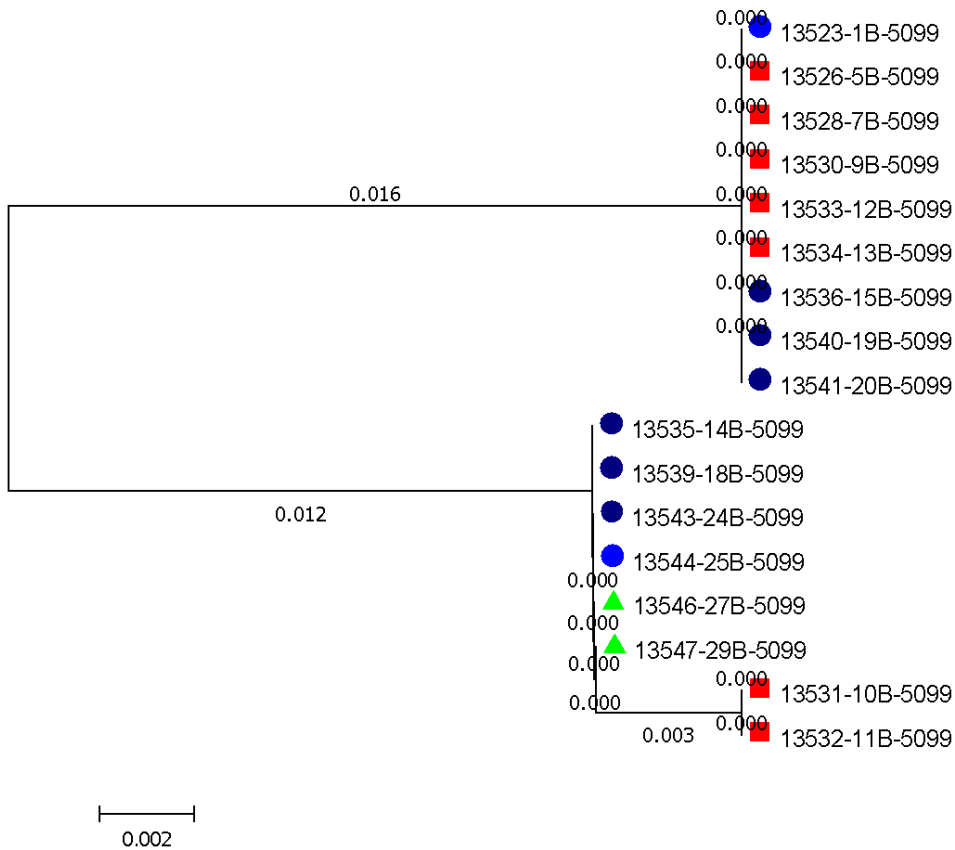
⁷⁹ HEMMATZADEH F. et al. Op cit.

⁸⁰ CAMARGOS MF, et al. Op cit.

⁸¹ FELMER R, MUÑOZ G, ZUÑIGA J, RECABAL M. Molecular analysis of 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp 51env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microb.* 2005. Vol. 108,p. 39–47

⁸² LICURSI M, et al. Op cit.

⁸³ ZAHO X, et al. Op cit.



- ▲ Finca A = 2 secuencias (2 genotipo 1)
- Finca B = 8 secuencias (4 genotipo 1, 4 genotipo 2)
- Finca C = 7 secuencias (2 genotipo 1, 5 genotipo 2)

Figura 5: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas diferenciando tipo de genotipo y finca de procedencia

En la finca A se detectó solo un genotipo que corresponde al genotipo1, y en las fincas B y C fueron encontrados el genotipo 1 y 2. En la finca A, los terneros recién nacidos eran de la finca, los animales no se habían introducido desde fuera por un largo periodo de tiempo y la gestión en bioseguridad es llevada con mucho cuidado mediante la implementación de buenas prácticas veterinarias. Lo que sugiere que el origen de la infección por VLB fue una vaca infectada, además el genoma de la región gp51 del VLB es bastante estable y se pudo haberse mantenido entre el ganado de la finca.

Durante el estudio en la finca A, una vaca murió y la necropsia mostró lesiones múltiples como neoplasia en varios órganos viscerales. En esta finca se encontró sólo el genotipo 1 asociado previamente con muestras tumorales en Japón⁸⁴. Sin embargo; cuando se describieron siete genotipos dedujeron no hay relación aparente entre el genotipo de las cepas virales que infectan y la manifestación clínica⁸⁵.

En las fincas B y C, se realiza la adquisición de animales de otros predios lecheros que tienen el mismo veterinario para el manejo reproductivo. Por lo tanto, la infección del VLB probablemente se originó a partir de varias vacas infectadas, y no puede ser asignado a mutaciones del VLB.

⁸⁴ MATSUMURA K, et al. Op cit.

⁸⁵ RODRIGUEZ SM et al. Op cit.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES.

En este estudio, se confirmó la presencia del VLB en todas las fincas lecheras muestreadas en la ciudad de Pasto.

Se identificaron dos genotipos del VLB, el genotipo 1 y el genotipo 2, siendo el más prevalente el genotipo 1, demostrando que diferentes genotipos del VLB se pueden encontrar en áreas geográficas similares.

Este es el primer intento de evaluar la situación epidemiológica de VLB en Colombia, utilizando un enfoque molecular. Podemos especular que esta situación podría ser el resultado de los acontecimientos de introducción independientes que se produjeron desde los EE.UU. y Europa hace muchos años.

El conocimiento de los genotipos del VLB que circulan en la región sur de Colombia será importante para la implementación de políticas de manejo de ganado apropiadas y el desarrollo de estrategias antivirales adecuadas y vacunas adecuadas para la región de América del Sur.

7.2 RECOMENDACIONES

Ejecutar estudios enfocados a establecer la prevalencia del VLB en diferentes zonas del departamento de Nariño.

Fomentar la investigación y estudios de tipo molecular en diferentes enfermedades que afectan al ganado bovino

Realizar estudios de caracterización molecular del virus de leucosis bovina en diferentes zonas del Departamento de Nariño con el fin de establecer si existen genotipos diferentes a los ya descritos

8. BIBLIOGRAFÍA

ANDUJAR, M. Virus y Cancer Biocancer 1. 2004. {En línea}. {17 abril 2014}. Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/247/virus-y-cancer>

BARUTA, D.A.; ARDOINO, S.M.; BRANDAN, J.L.; SOSA, R.E.1; MARIANI, E. L. ; ALBRETCH, E.M., Leucosis bovina enzoótica, ciencia veterinaria. 2011, vol 13 no 1, ISSN 1515-1883,p. 11

BETANCUR, H., & RODAS, G. Seroprevalencia de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. En: *Rev MVZ Córdoba*, 2008 vol.13 N.1, p. 1197-1204.

BEYER, J. ; KÖLLNER, B. ; TEIFKE, J.P. ; STARICK, E. ; BEIER, D. ; REIMANN, I. ; GRUNWALD, U. ; ZILLER, M. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. En: *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. Vol.49 N. 6, p.270-277.

BLOOD, D.C., & RADOSTITS, O.M. Medicina Veterinaria. Séptima edición. 1992 P. 878-886.

CAÑIBANO, E.. Leucosis Enzoótica Bovina. Facultad de ciencias veterinarias, Tandil 2011.p. 30.

CHAMIZO PESTANA, E.G. Leucosis Bovina Enzoótica. En: *Patología Orgánica y Enfermedades de los Animales Domésticos*.1997. 1º Ed. Félix Varela, La Habana. P. 209.

CHAMIZO PESTANA, E.G. Leucosis bovina enzoótica - Revisión. En: *Revista Electrónica Veterinaria* Vol. 7 p. 1-25.

DE SOUZA RAJÃO, D. Efeito da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros. Tesis ,(2008), p.26

DEQUIEDT, F.; HANON, E.; KERKHOF, P.; PASTORET, P.P.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Both wild-type and strongly attenuated bovine leukemia viruses protect peripheral blood mononuclear cells from apoptosis. En: *J Virol*. 1997 vol.71,p.630-639

DIGIACOMO, R.F. (1992a). The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Vet Med*, 87:248-257.

FECHNER, H., BLANKENSTEIN, P., LOOMAN, A. C., ELWERT, J., GEUE, L., ALBRECHT, C., & EBNER, D. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, 1997. 237(2), p. 261-269.

FEDEGAN., Federación Colombiana de Ganaderos. {En línea}. {16 Abril 2015} Disponible en la web:http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,1820326&_dad=portal&_schema=PORTA

FELMER R, MUÑOZ G, ZUÑIGA J, RECABAL M. Molecular analysis of 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp 51env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microb.* 2005. Vol. 108,p. 39–47

FELMER, R., ZUÑIGA, J., RECABAL. M. Estudio Comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la Leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. En: *Arch. Med. Vet.* 2006 vol 38, N° 2, p. 12-15

FERRER, J.F.; MARSHAK, R.R.; ABT, D.A.; KENYON, S.J.. Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. En: *Ann Rech Vet.* 1978 vol.9, N.4, p.851-857.

FULTON; JR.; B. E.; PORTELLA; M.; RADKE; K.. Dissemination of Bovine Leukemia Virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node. En: *Journal of Virology* 2006 vol.80 N.16,p. 7873–7884.

GALDINO DE LIMA, P.R. Prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no estado do Pará. Universidade Federal do Pará. 1999. citado por CADAVID, LASCARIO, Impacto del virus de la leucosis bovina en la producción de leche, Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, 2012 pág. 17

GILLET; N.; FLORINS; A.; BOXUS; M;; BURTEAU; C.; NIGRO; A.; VANDERMEERS; F.; BALON; H.; BOUZAR; A.B.; DEFOICHE; J.; BURNY; A.; REICHERT; M.; KETTMANN; R.; WILLEMS; L.. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel antiretroviral therapies in human. *Retrovirology.* 2007,p. 4-18

GIUSEPPE, A., FELIZIANI, F., RUTILI, D., MIA, G. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its

use in an enzyme-linked Immunosorbent assay. En: Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2004. Vol 11. p.147-151.

GIRAUDO, J., BÉRGAMO, E., SCHNEIDER, M., MAGNANO, G., MACIAS, A., STICOTTI, E., & MACIÓ., MAURO. Leucosis Enzootica Bovina. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 2010 {en línea}. {16 de abril 2015}. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar

GONZÁLEZ, E.T., OLIVA, G.A., VARELA, A., BONZO, E., LICURSI, M., ETCHEVERRIGARAY, M.E. Leucosis enzootica bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. En: *Analecta Veterinaria*, 2001 vol.21, no 2. p. 12-20

HAMILTON, V.T.; STONE, D.M.; CANTOR, G.H.. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology* 2003 vol. 315,p.135-47.

HAMILTON, V.T.; STONE, D.M.; CANTOR, G.H.. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology* 2003 vol. 315,p.135-47.

LEMEY P, SALEMI M, VANDAMME, A-M. The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. *Cambridge University Press*. 2009 vol. 23, p. 56-59

LICURSI M, INOSHIMA Y, WU D et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus*. 2002. Res 86, p. 101–110

LOZANO F., MONTENEGRO G. & LUQUE E. Linfossarcoma (leucemia) bovino, reporte de un caso de la forma juvenil. En: Rev. ICA, 1978 vol. 8 No.1, p. 205-214

LOZANO F., NEIRA L.R., MARIÑO O.C., SIERRA P. & LUQUE E. Linfossarcoma bovino en Colombia; presentación de la forma adulta de la enfermedad. En : Rev. Acovez, 1979 vol. 3 N.12, p. 29-32.

MALATESTINIC A. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma.. *Can Vet J*. 2003 vol. 44No 8 p. 664-666.

MARIÑO O.C., NEIRA R, RUEDA E. & LOZANO F. Preparación de antígeno para diagnóstico de la infección por virus de linfossarcoma bovino en Colombia. En: Rev. Acovez, 1980 vol. 5 No 17, p.3-7.

MARIÑO O.C. Situación de la investigación en leucosis bovina en Colombia. En: Rev. Acovez, 1984 vol 8 No.27, p. 22-26.

MESZAROS, J., ANTAL, T., POLNER, A., SZABÓ, I., ZENTMIKLÓSSY CS. TEKES, L. Experiences of the eradication of bovine leucosis in Hungary. *Magy. Áll. Lapja*, 41, 277-85. Citado por: CADAVID, LASCARIO, Impacto del virus de la leucosis bovina en la producción de leche, Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, 2012 pág. 35

MONTI G, FRANKENA K, ENGEL B, BUIST W, TARABLA H, M. DE JONG M. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. En: *J Vet Diagn Invest*. 2005. Vol. 17,p. 451–457

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2012. 6Th Edition. Chapter 2.4.11. Enzootic Bovine Leukosis. 729-738 (27/04/2015) disponible:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf

PARRA D., RAVE G. & MARIÑO O.C. Prevalencia serológica de la leucosis bovina en la Sabana de Bogotá durante 1980. En: Rev. ICA, 1982 vol,17, p. 45-50. Citado por: ALFONSO, R., ALMANSA, J.E., & BARRERA, C. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de la leucosis bovina enzootica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. *Rev Sic Tech Off Int Epi*. 1998 vol. 17, p. 723-732.

RAMA, G.. Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzootica Bovina. Universidad de la república. Montevideo, Uruguay. 2009, p. 40

RESOAGLI, JUAN P. - JACOBO, ROBERTO A. - STORANI, CARLOS A. CIPOLINI, MARÍA F. - DECO, M. - CORREA,E. Resultados Serológicos de Leucosis Enzootica Bovina en la Zona N.O. en Rodeos de Cría de la Provincia de Corrientes, Argentina. Catedra de enfermedades infecciosas. 1999.

ROLA-ŁUSZCZAK M, PLUTA A, OLECH M, DONNIK I, PETROPAVLOVSKIY M, et al. The Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus Isolates from Eastern Europe and Siberia and Its Impact on Phylogeny. En: *PLoS ONE* 2013 vol.8 no 3: p. 120-122

ROMERO, J.R., VILLAMIL, L.C., PINTO, J .A . Impacto económico de enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamérica: Estudios de caso, Reino Unido En: *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 1999 vol.18,p. 498-511

SAGATA,N., YASUNAGA,T., TSUZUKU-KAWAMURA,J., OHISHI,K., OGAWA,Y. AND IKAWA,Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985 vol. 82 (3), p. 677-681

SAITOU Y NEI N. M.The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. En: *Molecular Biology and Evolution*1987 vol.4,p. 406-425.

SCHELL; M.; HECKERT H.P.; MULLER; K.E.. Case report : lymphosarcoma in a cow. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2004, vol. 111, p. 38-41.

SERRANO, M. RODRIGUEZ, C. prevalencia del virus de leucosis bovina y formas de presentación de la enfermedad en hatos lecheros del municipio de Pasto, Nariño. 2012. p 5

TAMURA, M. NEI AND KUMAR S. Prospects for very large phylogenies inferred using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 2004 vol.101 p. 11030-11035.

TAMURA, STECHER G., D. PETERSON, FILIPSKI A., AND S. KUMAR (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. 2725-2729: *Molecular Biology and Evolution*30.

TRONO, K., PEREZ-FILGUEIRA, D.M. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitive and specificity of different detection methods. *Veterinary Microbiology* 2011 vol. 83,p. 235-248.

ZAHO X, BUEHRING G. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology* .2007. vol. 360, p. 150–165.